

(23.03.05)

REC'D 23 MAR 2005

WIPO

PCT



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

PCT/IB05/795



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2004 A 000598.

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li.....

16 DIC 2004

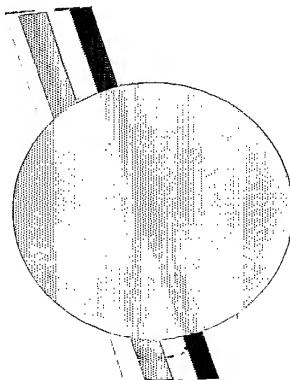
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RUL. E. 17.1(a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

.....Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto



MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° _____

MI 2004 A 0 0 0 5 9 8



10,33 Euro

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 RIZZUTO ROSARIO			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 RZZRSR62D15H501E	
INDIRIZZO COMPLETO	A4 PADOVA PD			
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 POZZAN TULLIO			
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 PZZTLL49B22F159L	
INDIRIZZO COMPLETO	A4 DOLO VE			
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO				
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B0 (D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)			
INDIRIZZO	B1			
C. / LOCALITA' / PROVINCIA	B2			
B3				
C. TITOLO				
C1 METODO PER LA RILEVAZIONE DI PARAMETRI INTRACELLULARI CON SONDE PROTEICHE LUMINESCENTI PER LO SCREENING DI MOLECOLE IN GRADO DI ALTERARE DETTI PARAMETRI				



11,00 Euro

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1 RIZZUTO ROSARIO			
NAZIONALITA'	D2			
COGNOME E NOME	D1 POZZAN TULLIO			
NAZIONALITA'	D2			
COGNOME E NOME	D1 GIORGI CARLOTTA			
NAZIONALITA'	D2			
COGNOME E NOME	D1 PINTON PAOLO			
NAZIONALITA'	D2			

E. CLASSE PROPOSTA SEZIONE E1 CLASSE E2 SOTTOCLASSE E3 GRUPPO E4 SOTTOGRUPPO E5

F. PRIORITA'					DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO			
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2			
NUMERO DOMANDA	F3				F4			
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2			
NUMERO DOMANDA	F3				F4			
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI					G1			
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I								

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

A/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTIVI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME: **I1 472BM GIULI MAURIZIO ED ALTRI;**

DENOMINAZIONE STUDIO **I2 Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.**

INDIRIZZO **I3 V.Borgonuovo 10**

CAP / LOCALITA' / PROVINCIA **I4 20121 Milano**

L. ANNOTAZIONI SPECIALI **L1 I TITOLARI PARTECIPANO AI DIRITTI SUL BREVETTO NELLE SEGUENTI MISURE:
RIZZUTO ROSARIO 35%
POZZAN TULLIO 35%
GIORGI CARLOTTA 15%
PINTON PAOLO 15%
AI SENSI DELL'ART. 19 R.D. 1127/39**

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.
(OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)

N.ES.ALL.	N.ES.RIS.	N.PAG.PER ESEMPLARE
1		53
1		2

DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE, 2 ESEMPLARI)

GNAZIONE D'INVENTORE

DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO

AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE

LETTERA D'INCARICO

(SI/NO)	
SI	
NO	
NO	

PROCURA GENERALE

RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE

ATTESTATI DI VERSAMENTO

FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)

DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)

SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)

DATA DI COMPILAZIONE

IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE		
QUATTROCENTOSETTANTADUE/56		
EURO	A	X
	D	F
SI		
NO		
26/03/2004		

RA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA:

MI 2004 A 000598

C.C.I.A.A. DI

MILANO

COD. **15**

IN DATA

26/03/2004

IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO

LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.

01

FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.

N. ANNOTAZIONI VARIE
DELL'UFFICIO ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE
CORTONESI MAURIZIO

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° MI 2004 A 0 0 0 5 9 8

FOGLIO AGGIUNTIVO 1
DI TOTALI: 1

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 GIORGI CARLOTTA		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 GRGCLT77S51C312Y
INDIRIZZO COMPLETO	A4 RONCOFERRARO MN		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 PINTON PAOLO		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PF	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 PNTPLA72R28G224P
INDIRIZZO COMPLETO	A4 PADOVA PD		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3			DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3			DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3			DATA DEPOSITO	F4	
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I						

PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA: **M1 2004 A 0 0 0 5 9 8**

DATA DI DEPOSITO:

26 MAR 2004

A. RICHIEDENTE/I Cognome e Nome o Denominazione, Residenza o Stato ;

1)RIZZUTO ROSARIO 2)POZZAN TULLIO 3)GIORGIO CARLOTTA 4)PINTON PAOLO - 1)PADOVA PD 2)DOLO VE 3)RONCOFERRARO MN
 4)PADOVA PD

C. TITOLO

METODO PER LA RILEVAZIONE DI PARAMETRI INTRACELLULARI CON SONDE PROTEICHE LUMINESCENTI PER LO SCREENING DI MOLECOLE IN GRADO DI ALTERARE DETTI PARAMETRI.

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

L. CLASSE PROPOSTA

--	--	--	--	--

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne un metodo per la rilevazione di parametri intracellulari mediante sonde proteiche ricombinanti luminescenti per lo screening di molecole in grado di generare l'alterazione di detti parametri intracellulari bersaglio.



P. DISEGNO PRINCIPALE

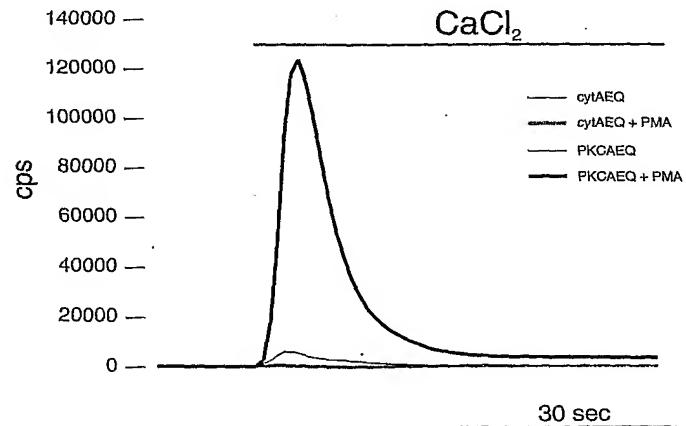
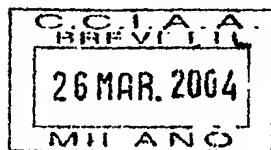


Fig.1

FIRMA DEL / DEI
 RICHIEDENTE / I



DESCRIZIONE dell'invenzione industriale

a nome: 1) RIZZUTO Rosario 2) POZZAN Tullio 3) GIORGI Carlotta 4) PINTON Paolo

di nazionalità: italiana

residenti in: 1) PADOVA PD 2) DOLO VE 3) RONCOFERRARO MN 4) PADOVA PD

MI 2004 A 0 0 0 5 9 8

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per la rilevazione di parametri intracellulari mediante sonde proteiche ricombinanti luminescenti, per lo screening di molecole in grado di alterare detti parametri.

In particolare, la presente invenzione concerne un metodo per rilevare parametri e/o attività intracellulari mediante sonde proteiche luminescenti per lo screening di molecole di interesse farmacologico e/o cosmetico e/o ambientale in grado di alterare detti parametri e/o attività.

Notoriamente le cellule costituenti l'organismo hanno un continuo scambio di informazioni, sia con le altre cellule sia con l'ambiente extracellulare.

La comunicazione tra le cellule è garantita dalla loro capacità di ricevere ed inviare segnali di natura chimica interagenti con specifici recettori presenti sulla loro membrana plasmatica. Nella mag-

gior parte dei casi, l'attivazione di questi recettori porta alla generazione dei messaggeri intracellulari, definiti secondi messaggeri, che trasmettono all'interno della cellula l'informazione portata dal messaggero extracellulare (o primo messaggero). In confronto all'estrema varietà dei mediatori extracellulari il numero di secondi messaggeri conosciuti è sorprendentemente limitato: lo ione calcio (Ca^{2+}), l'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3), il diacilglicero-
lo (DAG), i nucleotidi dell'adenosina e i nucleotidi ciclici (cAMP e cGMP).

Tali secondi messaggeri a loro volta, attivano una serie di esecutori intracellulari, definiti effettori della risposta cellulare, che attraverso la variazione di parametri intracellulari sono in grado di innescare una cascata di eventi fino ad ottenere la risposta cellulare definitiva.

Per parametri cellulari si intendono quei valori, quali concentrazione, stato di attivazione, localizzazione cellulare che ci permettono di capire e quindi di descrivere l'attività svolta da ogni singo-

lo elemento presente all'interno della cellula (ioni, proteine, nucleotidi, molecole segnale).

Per variazione di detti parametri cellulari si intende una modificazione dei normali indici basali (variazione di concentrazione, traslocazione alla membrana plasmatica, attivazione o inattivazione), in risposta a determinati stimoli (fisiologici o farmacologici) provenienti dall'ambiente extracellulare.

Fattori ambientali, chimici, fisici o genetici possono causare condizioni patologiche che conducono ad alterazioni delle vie di trasduzione del segnale cellulare.

Per comprendere il funzionamento di un farmaco è necessario avere a disposizione metodologie che permettano di monitorare correttamente i vari parametri intracellulari su cui si vuole che agiscano i farmaci e le loro variazioni.

Attualmente esistono tecniche per la rilevazione solo di alcuni mediatori cellulari coinvolti nelle vie di trasduzione del segnale e nella maggior parte dei casi tali tecniche non sono efficienti o e facilmente applicabili a metodologie di screening massic-

cio di migliaia di molecole, esigenza molto sentita invece, dall'industria farmaceutica, chimica o cosmetica.

Il mediatore cellulare più studiato, è stato ed è tuttora, lo ione calcio (Ca^{2+}). Si è visto che una grande varietà di stimoli, che vanno dai fattori di crescita ai neurotrasmettitori, sono trasmessi all'interno della cellula mediante variazioni della concentrazione citosolica del Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$).

Il Ca^{2+} è uno ione ubiquitario presente normalmente in tutti i compartimenti cellulari che attraverso variazioni della sua concentrazione è in grado di regolare numerose funzioni cellulari.

Lo sviluppo delle prime tecniche per la misura della concentrazione di Ca^{2+} risalgono agli anni '60 e permisero di cominciare a comprendere in dettaglio i meccanismi che regolavano la $[Ca^{2+}]_c$ e il suo ruolo nel controllo di svariate funzioni biologiche.

Le prime misure di $[Ca^{2+}]_c$ sono state fatte microiniettando in cellule giganti di *Balanus* una foto-proteina Ca^{2+} -sensibile, l'equorina (Ridgway e Ashley, 1967); negli anni successivi sono stati spesso



utilizzati gli indicatori metallocromici e i microelettrodi specifici. In entrambi i casi le tecniche erano limitate dalla necessità di microiniettare l'indicatore o di inserire un elettrodo nella cellula e quindi dalla possibilità di utilizzare pochi tipi cellulari di grandi dimensioni.

Negli anni '90 l'uso di indicatori fluorescenti del Ca^{2+} , quali, ad esempio, il quin2 ed il fura-2, in grado di attraversare la membrana plasmatica e di rimanere intrappolati a livello citoplasmtico (Tsien et al., 1982, Grynkiewicz et al., 1985), ha permesso di studiare l'omeostasi cellulare del Ca^{2+} in molti tipi cellulari e di dimostrare il ruolo ubiquitario di questo ione. Tuttavia, la facilità di impiego degli indicatori fluorescenti è contrastata dall'incapacità di essere selettivamente accumulati nei vari organelli cellulari.

Le tecniche summenzionate non sono tuttavia facilmente applicabili agli studi di screening farmacologico e sono comunque limitate alla misurazione del solo Ca^{2+} .

L'avvento delle tecniche di biologia molecolare ha contribuito, negli anni '90, allo sviluppo di nuove metodiche per il monitoraggio dello ione Ca^{2+} basate sulla costruzione di sonde proteiche che vengono introdotte all'interno delle cellule mediante tecniche di trasfezione. Attualmente sono disponibili due categorie di sonde ricombinanti per il Ca^{2+} .

Il primo gruppo sfrutta le caratteristiche fluorescenti di molecole derivate dalla proteina fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein, Zhang et al., 2002). Tali sonde sono di difficile utilizzo per lo screening farmacologico poiché richiedono procedure estremamente dispendiose in termini di tempo e il rapporto tra il segnale fluorescente ottenuto in condizioni di riposo e di attivazione non è sufficientemente ampio da poter essere utilizzato per metodi automatizzati.

La seconda categoria di sonde si basa sull'utilizzo di proteine bioluminescenti in grado di legare il Ca^{2+} ed emettere di conseguenza una radiazione luminosa misurabile e correlabile alla concentrazione di Ca^{2+} stessa, tra le quali l'equorina.

L'equorina, estratta e purificata nel 1962 da un genere di medusa luminescente, *Aequorea victoria* (Shimomura e al., 1962), è una proteina di circa 22 kDa costituita da una apoproteina e da un gruppo prostetico idrofobico, la celenterazina, legata all'apoproteina mediante un legame covalente di tipo perossidico.

Il legame del Ca^{2+} all'equorina a livello di 3 siti specifici ad alta affinità di tipo "EF-hand", induce una modificazione conformazionale della proteina stessa e conseguente rottura del legame covalente ed emissione di fotoni e rilascio del coenzima ossidato.

E' possibile misurare la variazione della $[\text{Ca}^{2+}]$ grazie all'esistenza di una relazione tra il logaritmo della velocità di emissione di fotoni (L), espressa come frazione rispetto alla velocità massima di luminescenza, cioè in condizioni di saturazione (L/L_{\max}) e il logaritmo della $[\text{Ca}^{2+}]$. Questi valori, ottenuti attraverso misurazioni *in vitro*, in condizioni note di pH, forza ionica $[\text{Mg}^{2+}]$ e temperatura consentono di costruire una curva di calibrazione di forma sigmoide, sulla base della quale, nell'ambito di concentrazioni

di Ca^{2+} comprese tra lo 0,1-10 μM (ed oltre i 100 μM utilizzando equorina mutata (Montero et al., 1995)), è possibile correlare in ogni istante la frazione di equorina consumata con il valore di $[\text{Ca}^{2+}]$ a cui la toproteina è esposta. Sulla base di questa relazione è basata la conversione del segnale luminoso ottenuta dalle cellule, in valori di $[\text{Ca}^{2+}]$.

L'equorina in qualità di marcatore bioluminescente presenta dei vantaggi rispetto agli indicatori fluorescenti in quanto può essere facilmente indirizzata nei vari compartimenti cellulari mediante l'utilizzo di appropriati elementi regolatori o peptidi segnale, rappresentando uno strumento affidabile per la misurazione delle variazioni di concentrazione di Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1992). In particolare in tale pubblicazione, è stata descritta la tecnica per direzionare e misurare le concentrazioni di Ca^{2+} a livello dei mitocondri.

Successivamente sono state sviluppate, diverse sonde ricombinanti di equorina direzionate agli altri compartimenti cellulari quali, ad esempio, nucleo (Brini et al., 1993; Brini et al., 1994a), il retico-



lo endoplasmatico (Montero et al., 1995), l'apparato del Golgi (Pinton et al., 1998), lo spazio intermembrana mitocondriale (Rizzuto et al., 1998), il reticollo sarcoplasmatico (Brini et al., 1997), la regione sotto la membrana (Marsault et al., 1997) che hanno reso possibile la determinazione delle variazioni della concentrazione di Ca^{2+} nei diversi distretti cellulari a seguito di stimolazioni di diversa natura.

Un altro vantaggio della luminescenza è che rispetto alla fluorescenza, non richiede una luce di eccitazione evitando i fenomeni di autofluorescenza e "photobleaching". Inoltre, l'equorina non è tossica, non forma legami con altri cationi e non interferisce con la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare.

Gli autori hanno precedentemente studiato l'utilizzo di una fotoproteina ricombinante Ca^{2+} sensibile, quale l'equorina, espressa in cellule di mammifero come metodo alternativo per la misura della concentrazione dello ione Ca^{2+} (Rizzuto et al., 1993; Rizzuto et al., 1994; Brini et al., 1994b; Rizzuto et al., 1995; Brini et al., 1995; De Giorgi et al.,

1996; Rutter et al., 1996; Brini et al., 1999; Robert et al., 2000; Porcelli et al., 2001; Chiesa et al., 2001).

L'impiego dell'equorina presenta una serie di vantaggi metodologici nel seguito descritti:

- a) ottimo rapporto segnale/rumore in quanto le cellule di mammifero non possiedono proteine luminescenti endogene;
- b) integra i dati di una popolazione trasfettata, evitando quindi errori dipendenti dalla variabilità cellulare;
- c) la sonda di equorina può essere stabilmente espressa da sola in una linea cellulare (ottenendo così un "permanente" e riproducibile sistema di screening), o stabilmente co-espressa con specifici recettori di interesse (quindi semplificando l'analisi funzionale degli specifici sistemi di segnalazione);
- d) sistema di rilevazione molto semplice, in quanto è sufficiente la raccolta dell'intero spettro di emissione della luce emessa, e che si presta alla miniaturizzazione del campione da analizzare ed alla

automatizzazione, perché il segnale luminoso è robusto (l'emissione di luce aumenta in maniera logaritmica alla variazione della concentrazione di Ca^{2+}).

Tuttavia, è interessante sottolineare che le variazioni dello ione calcio sebbene facilmente rilevabili sono coinvolte soltanto in alcune delle numerose vie di trasduzione del segnale di interesse farmaceutico. Come precedentemente anticipato invece esistono molte altre vie di trasduzione che coinvolgono altri elementi cellulari (effettori cellulari, enzimi, canali ionici, secondi messaggeri) di difficile rilevazione diretta, ma di notevole importanza per l'identificazione di molecole di potenziale interesse farmacologico o tossicologico.

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di metodi efficaci, sensibili e rapidi per la rilevazione di parametri e/o attività intracellulari, per lo screening di molecole atte a generare specifiche alterazioni di detti parametri e/o attività.

Gli autori della presente invenzione hanno ora sviluppato nuove metodiche in grado di rilevare in-

direttamente le variazioni di parametri intracellulari, riconducendo dette variazioni ad una corrispondente variazione della concentrazione dello ione Ca^{2+} facilmente rilevabile. In particolare, sono stati messi a punto sistemi di rilevazione bioluminescenti basati sull'utilizzo della fotoproteina equorina, in grado di emettere segnali luminosi in risposta a variazioni della concentrazione di Ca^{2+} , che riflettono la variazione di altri parametri o attività enzimatiche intracellulari in risposta a determinati stimoli fisiologici e/o farmacologici

La conversione dei parametri e delle attività intracellulari in una variazione della concentrazione di calcio permette sia di seguire la generazione di secondi messaggeri, come ad esempio il cAMP, sia l'attivazione e/o la traslocazione di proteine esecutrici, come ad esempio le PKC.

Tra le proteine esecutrici di interesse gli autori della presente invenzione hanno preso in considerazione, a scopo esemplificativo, le protein chinasi e in particolare la PKC. Poiché la PKC a seguito di attivazione trasloca dal citoplasma alla membrana



plasmatica ove la concentrazione dello ione calcio è maggiore rispetto alla concentrazione nel citoplasma, gli autori hanno creato una proteina chimerica PKC/equorina particolarmente sensibile alla diversa concentrazione di Ca^{2+} . Così, la traslocazione alla membrana e la conseguente attivazione della PKC sono state correlate ad un parametro indiretto quale la diversa concentrazione di Ca^{2+} nelle due zone cellulari (citoplasma e zona sottomembrana).

Gli autori dimostrano che il segnale luminoso della PKC-equorina a livello della membrana è (a causa della non linearità della funzione luminescenza rispetto alla $[Ca^{2+}]$) di almeno 50-100 volte più intenso rispetto a quello di una sonda PKC-equorina a livello citoplasmatico non attivata.

Un esperimento preliminare ottenuto con un prototipo di questa proteina chimerica è mostrato nella figura 1 che indica come il segnale luminescente della PKC-equorina chimerica è molto più intenso dopo induzione della traslocazione con un conosciuto attivatore della PKC (estere del forbolo PMA).

Il metodo individuato dagli autori consente di

quantificare in modo semplice, economico ed efficiente la traslocazione/attivazione delle proteine poiché l'emissione di luce aumenta proporzionalmente all'entità della traslocazione e di effettuare uno screening di composti attivi su tali proteine.

Parallelamente, gli autori della presente invenzione hanno applicato lo stesso sistema innovativo per convertire i valori di concentrazione di secondi messaggeri in valori di concentrazione di Ca^{2+} , ossia trasformando un segnale difficilmente quantizzabile in un segnale facilmente rivelabile utilizzando sempre l'equorina come sistema di rilevazione.

Tra i secondi messaggeri gli autori della presente invenzione hanno preso in esame il cAMP. In questo caso, sono stati sviluppati dei recettori chimERICI in cui è stata sostituita la porzione intracellularare del recettore originale, cioè quella in grado di dare inizio alla risposta cellulare attraverso la produzione di cAMP, con la porzione intracellularare di un recettore (accoppiato a proteine G) in grado di indurre una variazione della concentrazione di Ca^{2+} all'interno della cellula. In tal modo

il recettore chimerico una volta stimolato indurrà aumenti della concentrazione di calcio anziché di cAMP.

Come sonda di rilevazione è stata utilizzata un'equorina fusa ad una sequenza segnale che la direziona ai mitocondri (mt-AEQ) (Rizzuto et al., 1992), data la sua maggiore sensibilità dovuta al fatto che i mitocondri "amplificano" gli aumenti di concentrazione di calcio citosolica. Un esperimento preliminare è presentato in figura 2 e mostra che il segnale luminescente della sonda mt-AEQ è paragonabile in cellule trattate con uno stimolo normalmente associato ad aumenti della concentrazione di calcio (istamina) o trattate con uno stimolo associato ad aumenti della concentrazione di cAMP (isoproterenolo).

Un'altra applicazione di questo tipo di sonde luminescenti basate sull'equorina trovata dagli autori della presente invenzione è rappresentata dalla possibilità di analizzare l'attività catalitica di effettori cellulari (come la PKC) che agiscono sui canali ionici del calcio e di identificare farmaci che interferiscono con detta attività catalitica. I

canali del calcio sono localizzati sulle membrane di importanti compartimenti cellulari, quali ad esempio la membrana plasmatica, la membrana del reticolo endoplasmatico o la membrana mitocondriale interna. Essi sono coinvolti nella regolazione fine dell'omeostasi intracellulare del calcio ed alterazioni della loro funzione sono associate a condizioni patologiche.

A tale scopo, gli autori hanno impiegato una sonda di equorina appropriata (variabile a seconda del compartimento cellulare su cui si localizza il canale di interesse) ed una linea cellulare esprimente (endogenamente o in seguito ad ingegnerizzazione) il canale calcio regolato positivamente o negativamente dall'effettore cellulare, nel caso specifico dalla PKC in modo negativo.

Nel sistema realizzato dagli autori è possibile identificare le sostanze che agiscono inibendo l'attività catalitica della PKC attraverso la rilevazione di un aumento del segnale luminescente dell'equorina ad indicare il flusso di calcio attraverso il canale che non può essere chiuso dall'azione



enzimatica della chinasi.

Le diverse applicazioni delle sonde luminescenti realizzate dagli autori della presente invenzione consentono di effettuare screening differenziati delle molecole da testare ed essendo facilmente automatizzabili, possono essere impiegate sia per analisi HTS (high throughput screening) che per misure MTS (medium throughput screening) o LTS (low throughput screening).

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo di screening in accordo alle allegate rivendicazioni.

In accordo ad un primo aspetto dell'invenzione viene fornito un metodo di screening di molecole in grado di generare l'alterazione di un parametro intracellulare bersaglio, detta alterazione essendo convertita in una proporzionale variazione della concentrazione intracellulare dello ione Ca^{2+} rivelata mediante una sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile, comprendente le seguenti fasi:

- a) costruzione di un vettore di espressione contenente la sequenza codificante detta sonda, detta se-

quenza essendo caratterizzata dal fatto di comprendere le sequenze codificanti per una fotoproteina Ca^{2+} sensibile, preferibilmente l'equorina, e per almeno un'effettore cellulare o una sequenza segnale, fuse insieme;

- b) trasfezione di almeno una linea cellulare di mammifero con detto vettore contenente la sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile;
- c) attivazione dell'equorina mediante aggiunta di un gruppo prostetico, preferibilmente la celenterazina, alla linea cellulare esprimente detta sonda proteica ricombinante;
- d) somministrazione della molecola da testare alla linea cellulare esprimente detta sonda proteica ricombinante;
- e) rilevazione dell'emissione di fotoni da parte della fotoproteina Ca^{2+} sensibile, preferibilmente equorina, espressa nella linea cellulare.

Per maggiore chiarezza il termine "fotoproteina Ca^{2+} sensibile" si riferisce a qualsiasi sequenza amminoacidica in grado di emettere fotoni a seguito del legame con ioni calcio; particolarmente rilevanti da

un punto di vista applicativo sono le proteine equorina e obelina.

Per "proteina regolatrice" si intende qualsiasi sequenza amminoacidica in grado di modificare l'attività e/o la struttura di altre componenti cellulari, a seguito della sua interazione con altre molecole segnale.

Per "proteine che legano recettori di membrana" si intendono quelle sequenze amminoacidiche in grado di interagire con recettori posti a livello delle membrane cellulari. Tra queste è possibile distinguere adattatori che permettono l'interazione tra il recettore attivato e una terza proteina, e modulatori che interferiscono direttamente con l'attività del recettore.

Con il termine "proteine che legano canali di membrana" si indicano quelle sequenze amminoacidiche in grado di interagire con canali posti a livello delle membrane cellulari.

Inoltre, con il termine "proteine che legano lipidi di membrana" si identificano quelle sequenze am-

minoacidiche in grado di interagire con lipidi posti a livello delle membrane cellulari.

Infine, con il termine compartimento cellulare si intende qualsiasi regione all'interno della cellula preferibilmente delimitata da membrane cellulari quali: citoplasma, zona sotto la membrana plasmatica, nucleo, mitocondri, reticolo endo-sarcoplasmatico, apparato del Golgi, vescicole, liso-endosomi.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra un grafico che illustra la misura dell'entità della traslocazione della PKC;

la figura 2 mostra un grafico che illustra l'aumento della concentrazione di cAMP indotto da isoproterenolo.

ESEMPIO 1: Analisi della traslocazione alla membrana plasmatica di un effettore cellulare di interesse, la protein chinasi C (PKC).

MATERIALI E METODI

Costruzione sonda chimerica PKC-equorina



Per poter validare la nostra procedura sono state progettate diverse tipologie una serie di sonde chimeriche PKC-equorina ognuna contenente una diversa isoforma della PKC:

- 1) PKC beta-equorina (PKC beta: rif. M13975)
- 2) PKC delta-equorina (PKC delta: rif. M18330);
- 3) PKC epsilon-equorina (PKC epsilon: rif. AF028009);
- 4) PKC zeta-equorina (PKC zeta: rif. M18332);
- 5) PKC gamma-equorina;
- 6) PKC alfa-equorina (PKC alfa: rif. M13973);
- 7) PKC lambda-equorina;
- 8) PKC teta-equorina (PKC teta: rif. L07032);
- 9) PKC eta-equorina.

In particolare, la sequenza nucleotidica dell'equorina impiegata per la costruzione delle sonde PKC-equorina è la seguente:

ATG AAG CTT TAT GAT GTT CCT GAT TAT GCT AGC CTC AAA
CTT ACA TCA GAC TTC GAC AAC CCA AGA TGG ATT GGA CGA
CAC AAG CAT ATG TTC AAT TTC CTT GAT GTC AAC CAC AAT
GGA AAA ATC TCT CTT GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCA TCT
GAT ATT GTC ATC AAT AAC CTT GGA GCA ACA CCT GAG CAA
GCC AAA CGA CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA
GGA GCT GGA ATG AAA TAT GGT GTG GAA ACT GAT TGG CCT

GCA TAT ATT GAA GGA TGG AAA AAA TTG GCT ACT GAT GAA
TTG GAG AAA TAC GCC AAA AAC GAA CCA ACG CTC ATC CGT
ATA TGG GGT GAT GCT TTG TTT GAT ATC GTT GAC AAA GAT
CAA AAT GGA GCC ATT ACA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC
ACC AAA GCT GCT GGT ATC ATC CAA TCA TCA GAA GAT TGC
GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT ATT GAT GAA AGT GGA
CAA CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA GGA
TTT TGG TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC
GGT GGA GCT GTC CCC TAA.

Nello specifico esempio i risultati presentati sono relativi all'utilizzo della sonda PKC beta-equorina.

Questa sonda è stata ottenuta inserendo, in un vettore di espressione eucariotico (pcDNA3; 5,4 kb), la sequenza codificante l'isoforma di PKC beta fusa in frame con la sequenza codificante per l'equorina descritta precedentemente.

La localizzazione della sonda chimerica è determinata da peptidi segnali contenuti all'interno della sequenza nativa della proteina di cui si vuole seguire il destino intracellulare, nel caso specifico la PKC. L'aggiunta del cDNA dell'equorina al C-terminale

della sequenza codificante la PKC non altera né il direzionamento né il comportamento fisiologico della proteina in esame.

A questo punto si procede alla trasfezione in diverse linee cellulari della proteina sonda chimerica ottenuta, quali cellule HeLa, Cos 7 o Hek 293.

Ingegnerizzazione della linea cellulare

Nell'esempio mostrato non è stato necessario far esprimere preventivamente alla linea cellulare utilizzata nessun altro elemento per dare inizio alla risposta cellulare. E' possibile però, a seconda delle esigenze di studi, fare esprimere alle cellule un recettore specifico per la molecola/farmaco da testare al fine di assicurarsi un efficiente grado di legame semplificando così l'analisi funzionale dei sistemi di trasduzione.

Trasfezione cellulare

Le cellule coltivate su fiasche da colture cellulari (75 cm²) sono state trasfettate con un vettore contenente la sonda chimerica prodotta, mediante le tecniche di trasfezione più adatte alla linea cellulare in esame. Dato che come modello sperimentale è

stata impiegata la linea cellulare stabilizzata HeLa
è stata adottata la tecnica del calcio fosfato come
metodo di trasfezione che garantisce un'elevata per-
centuale di cellule positive per questa linea cellu-
lare.

Raccolta delle cellule esprimenti la sonda chimerica

Dopo 36 ore dalla trasfezione le cellule conte-
nute nella fiasca sono state staccate dal fondo per
tripsinizzazione. La sospensione cellulare è stata
quindi trasferita in un tubo Falcon (da 15 o 50 ml) e
sottoposta a centrifugazione a 1200 rpm a 20°C ed in-
fine il precipitato cellulare è stato risospeso in
KRB (Krebs-Ringer modified buffer: 125 mM NaCl, 5 mM
KCl, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 20 mM
HEPES, pH 7.4, 37°C).

Ricostituzione della fotoproteina equorina in forma
attiva

Alla sospensione di cellule esprimenti la sonda
PKC-equorina è stato aggiunto il gruppo prostetico
celenterazina alla concentrazione finale di 5µM.

Semina su piastre multipozzetto



Sono stati seminati 50 μ l di sospensione contenenti le cellule trasfettate (corrispondenti a circa 100.000 cellule) in ogni pozzetto della piastra. Le cellule sono state lasciate aderire per un tempo variabile da 1 a 2 ore mantenendole al buio, a causa della fotoinstabilità della celenterazina.

Rilevazione della risposta

Al termine del tempo di incubazione sono state aggiunte in ogni pozzetto le diverse molecole da testare ed infine la piastra con le cellule trattate è stata posta a diretto contatto con un fotomoltiplicatore che misura l'emissione di fotoni da parte dell'equorina.

RISULTATI

Questo semplice test può essere utilizzato per testare composti in grado di modulare la traslocazione della PKC nelle cellule vive.

Nella figura 1 è mostrato un grafico dove è riportata la misurazione della traslocazione della PKC secondo il metodo sopra descritto.

L'esempio riportato è stato condotto su due "batch" paralleli di cellule:

a) cellule HeLa esprimenti la sonda PKC-equorina (PKC-AEQ) (linee scure).

Tali cellule sono state a loro volta suddivise in:

- cellule HeLa PKC-equorina trattate con PMA (1 μ M, SIGMA) per mimare l'azione di un farmaco (linea scura spessa);
- cellule HeLa PKC-equorina controllo (linea scura sottile);

b) cellule HeLa esprimenti la sonda equorina citosolica (cyt-AEQ) (non fusa a nessuna proteina) (linee chiare).

Tali cellule sono state a loro volta suddivise in:

- cellule HeLa con equorina citosolica trattate con PMA per mimare l'azione di un farmaco (linea chiara spessa);
- cellule HeLa con equorina citosolica controllo (linea chiara sottile).

Come si può notare dall'andamento del grafico riportato in figura 1 in assenza di calcio esterno l'emissione di fotoni (espressa come cps: conte per

secondo) è di intensità molto bassa, in tutte le condizioni esaminate. Infatti, in tali condizioni la concentrazione di calcio nel citoplasma, dove si localizzano le sonde cyt-AEQ (sia in assenza che in presenza di estere del forbolo PMA) e PKC-AEQ (in assenza di PMA) e sotto la membrana plasmatica, ossia dove trasloca la sonda PKC-AEQ a seguito di trattamento con PMA, è molto bassa.

L'aggiunta di calcio esterno induce un sostenuto flusso di tale ione attraverso i canali posti sulla membrana plasmatica con conseguente aumento della concentrazione di calcio nella regione sotto la membrana plasmatica. In tali condizioni si registra un enorme aumento di emissione di fotoni solamente nelle cellule esprimenti la sonda PKC-AEQ trattate con PMA ad indicare l'avvenuta traslocazione della chinasi.

In tutti gli altri gruppi di cellule non si verifica nessuna variazione significativa dell'emissione di fotoni da parte dell'equorina.

Risulta evidente dal grafico che tutti i valori di cps superiori a quelli osservati in assenza dell'attivatore massimale (PMA) indicheranno un'av-

venuta traslocazione della chinasi. Con tale sistema è quindi possibile non solo individuare le molecole in grado di indurre una traslocazione ma anche di valutarne l'efficienza con cui si verifica, esprimendola sulla base di un range compreso tra il valore di cps ottenuto in condizioni di controllo (senza PMA) e quello ottenuto a seguito di traslocazione massimale (dopo trattamento con PMA).

Tale risultato dimostra chiaramente la validità del sistema proposto per misurare la traslocazione di proteine dal compartimento citosolico alla membrana plasmatica in risposta a stimoli esterni.

ESEMPIO 2: Analisi della variazione di concentrazione di un secondo messaggero cellulare di interesse, il cAMP.

MATERIALI E METODI

Costruzione sonda mt-AEQ

La descrizione della sonda mt-AEQ è dettagliatamente descritta nell'articolo (Rizzuto et al., 1992).

Ingegnerizzazione della linea cellulare di espressione della sonda mt-equorina

Per tale applicazione è stata ingegnerizzata una



linea cellulare in modo che fosse in grado di esprimere un recettore chimerico sul quale testare un certo farmaco in grado di regolare le funzioni dell'cAMP.

E' stato utilizzato un recettore chimerico costruito fondendo la porzione extracellulare di un recettore beta adrenergico (accoppiato alla produzione di cAMP) con la porzione intracellulare di un recettore alfa adrenergico (accoppiato a variazioni della concentrazione di calcio) (Cotecchia et al., 1992) nel seguito nominato recettore beta/alfa adrenergico.

Detto recettore è stato espresso in cellule HeLa ottenendo così una linea cellulare ingegnerizzata in grado di rispondere alla stimolazione con un determinato farmaco di interesse.

Trasfezione cellulare

La linea cellulare così ingegnerizzata è stata quindi trasfettata con il vettore contenente la sonda mt-AEQ mediante la tecnica del calcio fosfato.

Raccolta delle cellule esprimenti la sonda chimerica

Dopo 36 ore dalla trasfezione le cellule, coltivate su fiasche da colture cellulari (75 cm²), sono

state staccate dal fondo per tripsinizzazione. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in un tubo Falcon (da 15 o 50 ml) e sottoposta a centrifugazione a 1200 rpm, in centrifuga da cellule a 20°C ed infine il precipitato cellulare è stato risospeso in KRB/Ca²⁺ (Krebs-Ringer modified buffer: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4, 37°C).

Ricostituzione della fotoproteina equorina in forma attiva

E' stato aggiunto il gruppo prostetico celenterazina alla concentrazione finale di 5µM alla sospensione di cellule ingegnerizzate ed esperimenti la sonda mt-AEQ.

Semina su piastre multipozzetto

Sono state seminati in ogni pozzetto della piastra 50µl di sospensione contenente le cellule trasfettate (corrispondenti a circa 100.000 cellule) che sono state lasciate aderire per un tempo variabile da 1 a 2 ore mantenendole al buio per la fotolabilità della celenterazina.

Rilevazione della risposta

Al termine del tempo di incubazione sono state aggiunte in ogni pozzetto le diverse molecole da testare ed infine la piastra con le cellule trattate è stata posta a diretto contatto con un fotomoltiplicatore che misura l'emissione di fotoni da parte dell'equorina.

RISULTATI

Questo semplice test pertanto può essere utilizzato per testare composti in grado di indurre, attraverso l'attivazione di specifici recettori, variazioni della concentrazione di cAMP.

L'esperimento è stato condotto su cellule HeLa esprimenti il recettore chimerico (β/α adrenergico) e la sonda mt-AEQ.

Tali cellule sono state trattate con:

- Istamina (100 μ M, SIGMA) per indurre il normale aumento di calcio dovuto alla stimolazione del recettore endogeno per l'istamina H1 (linea scura).
- Isoproterenolo (100 μ M, SIGMA) per indurre un aumento di calcio dovuto alla stimolazione del recettore chimerico (linea chiara).

Come controllo sono state utilizzate cellule He-La esprimenti un recettore beta adrenergico che sono stimolate con isoproterenolo per indurre la stimolazione di tale recettore.

Nella figura 2 è mostrato il grafico che riporta un esempio di misurazione della produzione e della variazione di concentrazione di cAMP con il metoclopramide sopra descritto. Come si può apprezzare dall'analisi del grafico in assenza di stimolazione l'emissione di fotoni (cps: conte per secondo) è molto bassa, quasi nulla. In tali condizioni basali infatti, la concentrazione di calcio nella matrice mitocondriale dove si localizzano le sonde mt-AEQ è molto bassa.

La stimolazione con istamina induce un notevole e transiente aumento della concentrazione di calcio nella matrice mitocondriale come ampiamente descritto in letteratura (Rizzuto et al., 1992).

Tale aumento si riflette in un'enorme emissione di fotoni da parte dell'equorina (da meno di 20 fotoni emessi al secondo si passa a più di 120000 fotoni).



Per verificare la validità del sistema proposto abbiamo stimolato le cellule con un agonista specifico della porzione extracellulare del recettore chimico (isoproterenolo). La linea chiara mostra come anche in questo caso si verifichi un significativo aumento dell'emissione di fotoni da parte dell'equorina (da meno di 20 fotoni emessi al secondo si passa a più di 120000) indicando come la stimolazione con isoproterenolo (normalmente accoppiata alla produzione e all'aumento della concentrazione di cAMP) sia convertita in un segnale legato alla variazione della concentrazione di calcio. Al contrario la stimolazione con isoproterenolo di cellule esperimenti un recettore beta adrenergico, accoppiato quindi alla produzione di cAMP, non induce nessun aumento di cps ad indicare il mancato aumento di concentrazione di calcio. Risulta evidente che qualsiasi sostanza che induce un aumento di cps in cellule esperimenti un recettore chimico avente la porzione intracellulare accoppiata a variazioni della concentrazione di calcio, sarà in grado di modificare la concentrazione di cAMP.

Tale risultato dimostra chiaramente la validità del sistema proposto per misurare l'attivazione di specifici recettori accoppiati alla produzione di cAMP.

ESEMPIO 3: Analisi della attivazione/inibizione dell'attività catalitica di un effettore cellulare di interesse, la PKC, nel controllo dello stato funzionale dei canali per il calcio.

Per validare tale metodica sono stati condotti esperimenti di analisi dell'attività catalitica della PKC su specifici canali calcio posti a livello della membrana plasmatica denominati canali Ca^{2+} di tipo L.

Nel caso specifico le cellule sono state trasfettate con un canale Ca^{2+} di tipo L, inibito da una fosforilazione PKC-dipendente, e con una sonda rappresentata da un'equorina localizzata sotto la membrana plasmatica (SNAP-AEQ) (Marsault et al., 1997), a diretto contatto con il canale in esame.

MATERIALI E METODI

Costruzione sonda SNAP-AEQ

La descrizione della sonda SNAP-AEQ è dettagliatamente descritta nell'articolo (Marsault et al., 1997).

Ingegnerizzazione della linea cellulare di espressione della sonda SNAP-AEQ

Per tale applicazione è necessario ingegnerizzare una linea cellulare con il canale calcio (in questo caso di tipo L).

Le cellule HeLa sono state ingegnerizzate in modo da esprimere il canale calcio la cui attività è regolata dall'effettore cellulare di interesse (PKC).

Trasfezione cellulare

La linea cellulare ingegnerizzata è stata quindi trasfettata con il vettore contenente la sonda SNAP-AEQ mediante la tecnica del calcio fosfato.

Raccolta delle cellule esprimenti la sonda chimerica

Dopo 36 ore dalla trasfezione le cellule, coltivate su fiasche da colture cellulari (75 cm²), sono state staccate dal fondo per tripsinizzazione. La sospensione cellulare è stata quindi trasferita in un tubo Falcon (da 15 o 50 ml) e sottoposta a centrifuga-

gazione a 1200 rpm, in centrifuga da cellule a 20°C ed infine il precipitato cellulare è stato risospeso in KRB (Krebs-Ringer modified buffer: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4, 37°C).

Ricostituzione della fotoproteina equorina in forma attiva

Alle sospensioni delle cellule ingegnerizzate ed esperimenti la sonda SNAP-AEQ è stato aggiunto il gruppo prostetico celenterazina alla concentrazione finale di 5 μ M.

Semina su piastre multipozzetto

In ogni pozzetto della piastra sono stati semi-nati 50 μ l di sospensione contenente le cellule trasfettate e ricostituite (corrispondenti a circa 100.000 cellule) e lasciate aderire per un tempo variabile da 1 a 2 ore mantenendole al buio poiché la celenterazina è fotolabile.

Rilevazione della risposta

Al termine del tempo di incubazione sono state aggiunte in ogni pozzetto le diverse molecole da testare ed infine la piastra con le cellule trattate è



stata posta a diretto contatto con un fotomoltiplicatore che misura l'emissione di fotoni da parte dell'equorina.

Con questo test sarà possibile individuare le molecole in grado di modificare l'attività catalitica di effettori cellulari di interesse e di conseguenza lo stato funzionale dei canali calcio.

BIBLIOGRAFIA

- Brini, M., M. Murgia, L. Pasti, D. Picard, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1993. *EMBO J.* 12:4813-4819.
- Brini, M., R. Marsault, C. Bastianutto, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1994a. *Cell Calcium* 16:259-268.
- Brini, M., L. Pasti, C. Bastianutto, M. Murgia, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1994b. *J. Biolumin. Chemilumin.* 9:177-184.
- Brini, M., R. Marsault, C. Bastianutto, J. Alvarez, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:9896-9903.
- Brini, M., F. De Giorgi, M. Murgia, R. Marsault, M. L. Massimino, M. Cantini, R. Rizzuto, and T. Pozzan. 1997. *Mol. Biol. Cell* 8:129-143.
- Brini, M., P. Pinton, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 1999. *Microsc. Res. Tech.* 46:380-389.

- Chiesa,A., E.Rapizzi, V.Tosello, P.Pinton, M.de
Virgilio, K.E.Fogarty, and R.Rizzuto. 2001. *Biochem.*
J. 355:1-12.

- Cotecchia,S., J.Ostrowski, M.A.Kjelsberg,
M.G.Caron, and R.J.Lefkowitz. 1992. *J. Biol. Chem.*
267:1633-1639.

- De Giorgi,F., M.Brini, C.Bastianutto,
R.Marsault, M.Montero, P.Pizzo, R.Rossi, and
R.Rizzuto. 1996. *Gene* 173:113-117.

- Grynkiewicz,G., M.Poenie, and R.Y.Tsien. 1985.
J. Biol. Chem. 260:3440-3450.

- Marsault,R., M.Murgia, T.Pozzan, and R.Rizzuto.
1997. *EMBO J.* 16:1575-1581.

- Montero,M., M.Brini, R.Marsault, J.Alvarez,
R.Sitia, T.Pozzan, and R.Rizzuto. 1995. *EMBO J.*
14:5467-5475.

- Pinton, P., T.Pozzan, and R.Rizzuto. 1998. *EMBO J.* 17:5298-5308.

- Porcelli,A.M., P.Pinton, E.K.Ainscow, A.Chiesa, M.Rugolo, G.A.Rutter, and R.Rizzuto. 2001. *Methods Cell Biol.* 65:353-380.



- Ridgway,E.B. and C.C.Ashley. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29:229-234.

- Rizzuto,R., A.W.Simpson, M.Brini, and T.Pozzan. 1992. *Nature* 358:325-327.

- Rizzuto,R., M.Brini, and T.Pozzan. 1993. *Cytotechnology* 11 Suppl 1:S44-S46.

- Rizzuto,R., M.Brini, and T.Pozzan. 1994. *Methods Cell Biol.* 40:339-358.

- Rizzuto,R., M.Brini, C.Bastianutto, R.Marsault, and T.Pozzan. 1995. *Methods Enzymol.* 260:417-428.

- Rizzuto,R., P.Pinton, W.Carrington, F.S.Fay,
K.E.Fogarty, L.M.Lifshitz, R.A.Tuft, and T.Pozzan.
1998. *Science* 280:1763-1766.

- Robert,V., P.Pinton, V.Tosello, R.Rizzuto, and
T.Pozzan. 2000. *Methods Enzymol.* 327:440-456.

- Rutter,G.A., P.Burnett, R.Rizzuto, M.Brini,
M.Murgia, T.Pozzan, J.M.Tavare, and R.M.Denton. 1996.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93:5489-5494.

- Shimomura,O., F.H.JOHNSON, and Y.SAIGA. 1962. *J. Cell Comp Physiol* 59:223-239.

- Tsien,R.Y., T.Pozzan, and T.J.Rink. 1982. *Nature* 295:68-71.

- Zhang,J., R.E.Campbell, A.Y.Ting, and R.Y.Tsien.
2002. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:906-918.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di screening di molecole in grado di generare l'alterazione di un parametro intracellulare bersaglio, detta alterazione essendo convertita in una proporzionale variazione della concentrazione intracellulare dello ione Ca^{2+} rivelata mediante una sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile, comprendente le seguenti fasi:
 - a) costruzione di un vettore di espressione contenente la sequenza codificante detta sonda, detta sequenza essendo caratterizzata dal fatto di comprendere le sequenze codificanti per almeno una fotoproteina Ca^{2+} sensibile e per almeno un'effettore cellulare o una sequenza segnale, fuse insieme;
 - b) trasfezione di almeno una linea cellulare di mammifero con detto vettore contenente la sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile;
 - c) attivazione di detta fotoproteina Ca^{2+} sensibile mediante aggiunta di un gruppo prostetico alla linea cellulare esprimente detta sonda proteica ricombinante;
 - d) somministrazione della molecola da testare alla

linea cellulare esprimente detta sonda proteica ri-combinante;

e) rilevazione dell'emissione di fotoni da parte della fotoproteina Ca^{2+} sensibile espressa nella linea cellulare.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta fotoproteina Ca^{2+} sensibile è l'equorina.

3. Metodo secondo le rivendicazioni 1 e 2, in cui detto gruppo prostetico è la celenterazina.

4. Metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 3, in cui detta alterazione di un parametro intracellulare è scelta dal gruppo che comprende variazione di concentrazione di un secondo messaggero, traslocazione alla membrana o stato di attivazione/inattivazione di un effettore cellulare.

5. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui detto secondo messaggero è scelto dal gruppo che comprende nucleotidi ciclici, nucleotidi dell'adenosina, diacilglicerolo, Ca^{2+} e inositolo 1,4,5 trifosfato.

6. Metodo secondo la rivendicazione 4, in cui detto effettore cellulare è scelto dal gruppo che consiste in canale ionico, proteina regolatrice, recettore di

membrana cellulare.

7. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui detto canale ionico è scelto dal gruppo che comprende canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori-canale del Ca^{2+} .

8. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui detta proteina regolatrice è scelta dal gruppo che comprende protein-chinasi, fosfatasi, adenilato ciclasi, proteine che legano recettori di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con canali di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con i lipidi della membrana plasmatica.

9. Metodo secondo la rivendicazione 6, in cui detto recettore di membrana cellulare è scelto dal gruppo che comprende recettori accoppiati a proteine G, recettori ad attività enzimatica, recettori canale.

10. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui detta sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile è caratterizzata dal fatto di comprendere la sequenza amminoacidica di almeno una fotoproteina Ca^{2+} sensibile, o parti di essa.

11. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui la

sonda proteica comprende ulteriormente una sequenza segnale e/o la sequenza amminoacidica di un effettore cellulare.

12. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui detto effettore cellulare è scelto dal gruppo che consiste in canale ionico, proteina regolatrice, recettore di membrana cellulare.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto canale ionico è scelto dal gruppo che comprende canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori canale del Ca^{2+} .

14. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detta proteina regolatrice è scelta dal gruppo che comprende protein-chinasi, fosfatasi, adenilato ciclasi, proteine che legano recettori di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con canali di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con i lipidi della membrana plasmatica.

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui dette protein-chinasi sono le protein chinasi C (PKC).

16. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto recettore di membrana cellulare è scelto dal grup-

po che comprende recettori accoppiati a proteine G, recettori ad attività enzimatica, recettori canale.

17. Metodo secondo le rivendicazioni 10 e 11, in cui detta sequenza segnale indirizza la fotoproteina Ca^{2+} sensibile, preferibilmente l'equorina, ad un compartimento cellulare.

18. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 10 a 17, in cui la sonda proteica è una proteina di fusione scelta dal gruppo che consiste in PKC-equorina (PKC-AEQ), SNAP-equorina (SNAP-AEQ), mt-equorina (mt-AEQ), equorina citosolica (cyt-AEQ).

19. Metodo secondo la rivendicazione 18, in cui la PKC-equorina è scelta dal gruppo che comprende PKC beta-equorina, PKC delta-equorina, PKC epsilon-equorina, PKC zeta-equorina, PKC gamma-equorina, PKC alfa-equorina, PKC lambda-equorina, PKC teta-equorina, PKC eta-equorina.

20. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il vettore di espressione della fase a) è un vettore eucariotico.

21. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta almeno una linea cellulare di mammifero è preventa



tivamente ingegnerizzata in modo tale da esprimere una proteina eterologa, nativa o chimerica.

22. Metodo secondo la rivendicazione 21, in cui detta proteina eterologa è scelta dal gruppo che consiste in un recettore, un enzima, un canale ionico o un effettore cellulare.

23. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui detto recettore è un recettore chimerico.

24. Metodo secondo la rivendicazione 23, in cui detto recettore chimerico è caratterizzato dal fatto di avere la porzione intracellulare di un recettore accoppiato a variazioni della concentrazione di calcio e la porzione extracellulare di un recettore accoppiato alla produzione di cAMP.

25. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui detto canale ionico è scelto dal gruppo che comprende canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori canale del Ca^{2+} .

26. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui detto effettore cellulare è scelto dal gruppo che consiste in canale ionico, proteina regolatrice, recettore di membrana cellulare.

27. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui det-

to canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori canale del Ca^{2+} .

28. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui detta proteina regolatrice è scelta dal gruppo che comprende protein-chinasi, fosfatasi, adenilato ciclasi, proteine che legano recettori di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con canali di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con i lipidi della membrana plasmatica.

29. Metodo secondo la rivendicazione 26, in cui detto recettore di membrana cellulare è scelto dal gruppo che comprende recettori accoppiati a proteine G, recettori ad attività enzimatica, recettori canale.

30. Sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile caratterizzata dal fatto di comprendere le sequenze amminoacidiche di almeno una fotoproteina Ca^{2+} sensibile, o parti di essa, e di un effettore cellulare o una sequenza segnale, fuse insieme.

31. Sonda secondo la rivendicazione 30, in cui detta fotoproteina Ca^{2+} sensibile è l'equorina.

32. Sonda secondo le rivendicazioni 30 e 31, in cui detta sonda proteica comprende ulteriormente una se-

quenza segnale e/o la sequenza amminoacidica di un effettore cellulare.

33. Sonda secondo le rivendicazioni da 30 a 32, in cui detto effettore cellulare è scelto dal gruppo che consiste in canale ionico, proteina regolatrice, recettore di membrana cellulare.

34. Sonda secondo la rivendicazione 33, in cui detto canale ionico è scelto dal gruppo che comprende canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori canale del Ca^{2+} .

35. Sonda secondo la rivendicazione 33, in cui detta proteina regolatrice è scelta dal gruppo che comprende protein-chinasi, fosfatasi, adenilato ciclasi, proteine che legano recettori di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con canali di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con i lipidi della membrana plasmatica.

36. Sonda secondo la rivendicazione 35, in cui dette protein-chinasi sono le protein chinasi C (PKC).

37. Sonda secondo ognuna delle rivendicazioni da 30 a 36, in cui detta sonda è una proteina di fusione che consiste in PKC-equorina (PKC-AEQ).

38. Sonda secondo la rivendicazione 37 in cui la PKC-equorina è scelta dal gruppo che comprende PKC beta-equorina, PKC delta-equorina, PKC epsilon-equorina, PKC zeta-equorina, PKC gamma-equorina, PKC alfa-equorina, PKC lambda-equorina, PKC teta-equorina PKC eta-equorina.

39. Sonda secondo la rivendicazione 33, in cui detto recettore di membrana cellulare è scelto dal gruppo che comprende recettori accoppiati a proteine G, recettori ad attività enzimatica, recettori canale.

40. Sonda secondo le rivendicazioni da 30 a 39, in cui detta sequenza segnale indirizza la fotoproteina Ca^{2+} sensibile, preferibilmente l'equorina, ad un compartimento cellulare.

41. Uso della sonda proteica ricombinante Ca^{2+} sensibile come definita nelle rivendicazioni da 30 a 40, per lo screening di molecole in grado di generare l'alterazione di un parametro intracellulare, detta alterazione essendo convertita in una proporzionale variazione della concentrazione intracellulare dello ione Ca^{2+} .

42. Uso secondo la rivendicazione 41, in cui detta



alterazione di un parametro intracellulare è scelta dal gruppo che comprende variazione di concentrazione di un secondo messaggero, traslocazione alla membrana o stato di attivazione/inattivazione di un effettore cellulare.

43. Uso secondo la rivendicazione 42, in cui detto secondo messaggero è scelto dal gruppo che comprende nucleotidi ciclici, nucleotidi dell'adenosina, diacilglicerolo, Ca^{2+} e inositolo 1,4,5 trifosfato.

44. Uso secondo la rivendicazione 42, in cui detto effettore cellulare è scelto dal gruppo che consiste in canale ionico, proteina regolatrice, recettore di membrana cellulare.

45. Uso secondo la rivendicazione 44, in cui detto canale ionico è scelto dal gruppo che comprende canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti e recettori canale del Ca^{2+} .

46. Uso secondo la rivendicazione 44, in cui detta proteina regolatrice è scelta dal gruppo che comprende protein-chinasi, fosfatasi, adenilato ciclasi, proteine che legano recettori di membrana plasmatica, proteine che interagiscono con canali di membrana

plasmatica, proteine che interagiscono con i lipidi della membrana plasmatica.

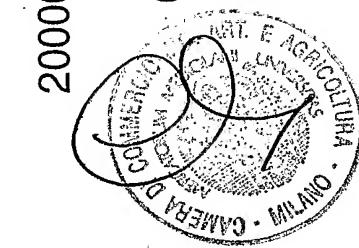
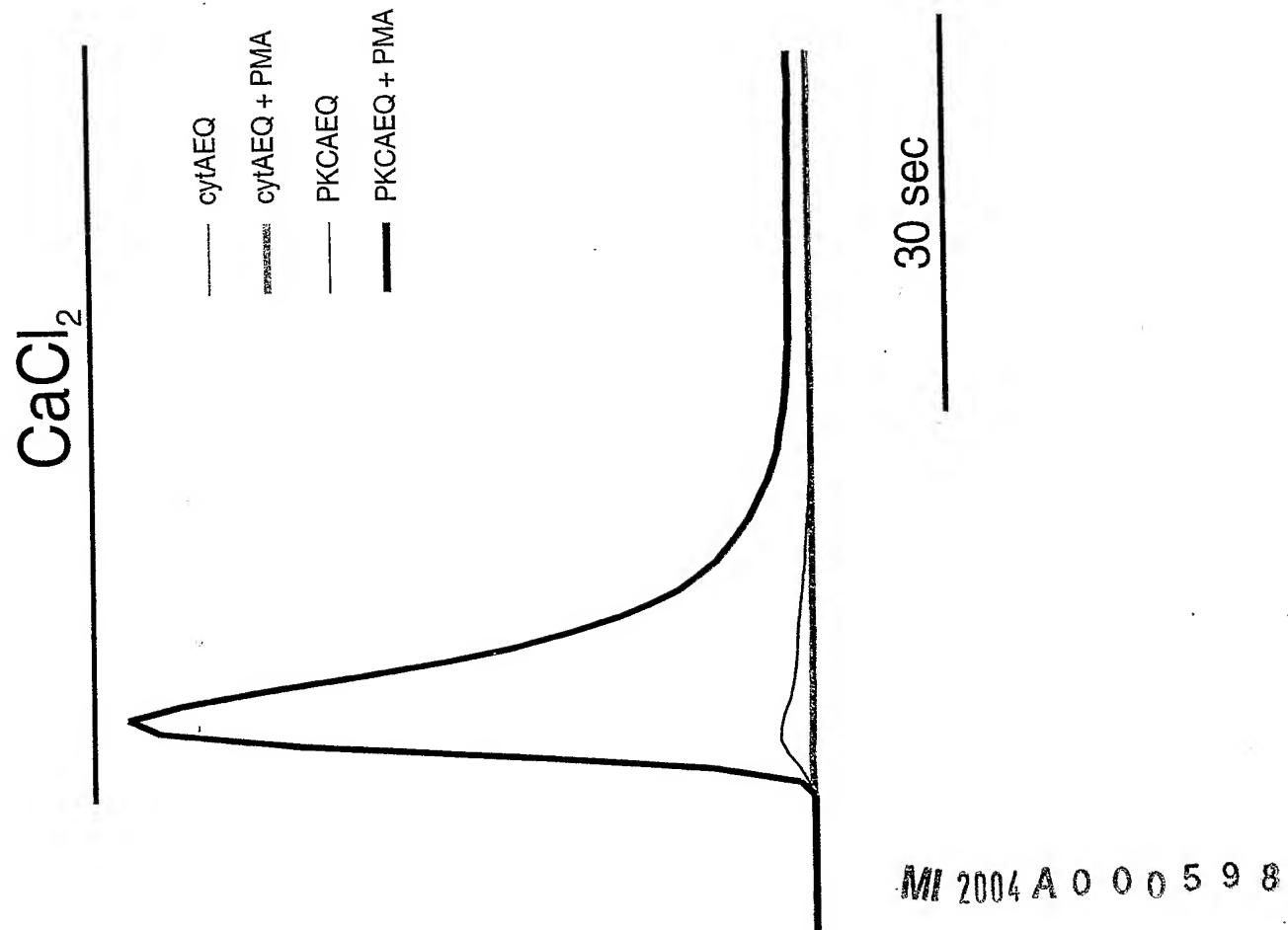
47. Uso secondo la rivendicazione 44, in cui detto recettore di membrana cellulare è scelto dal gruppo che comprende recettori accoppiati a proteine G, recettori ad attività enzimatica, recettori canale.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

I MANDATAR^h
(firma)

Allegro
(per sé o per gli altri)

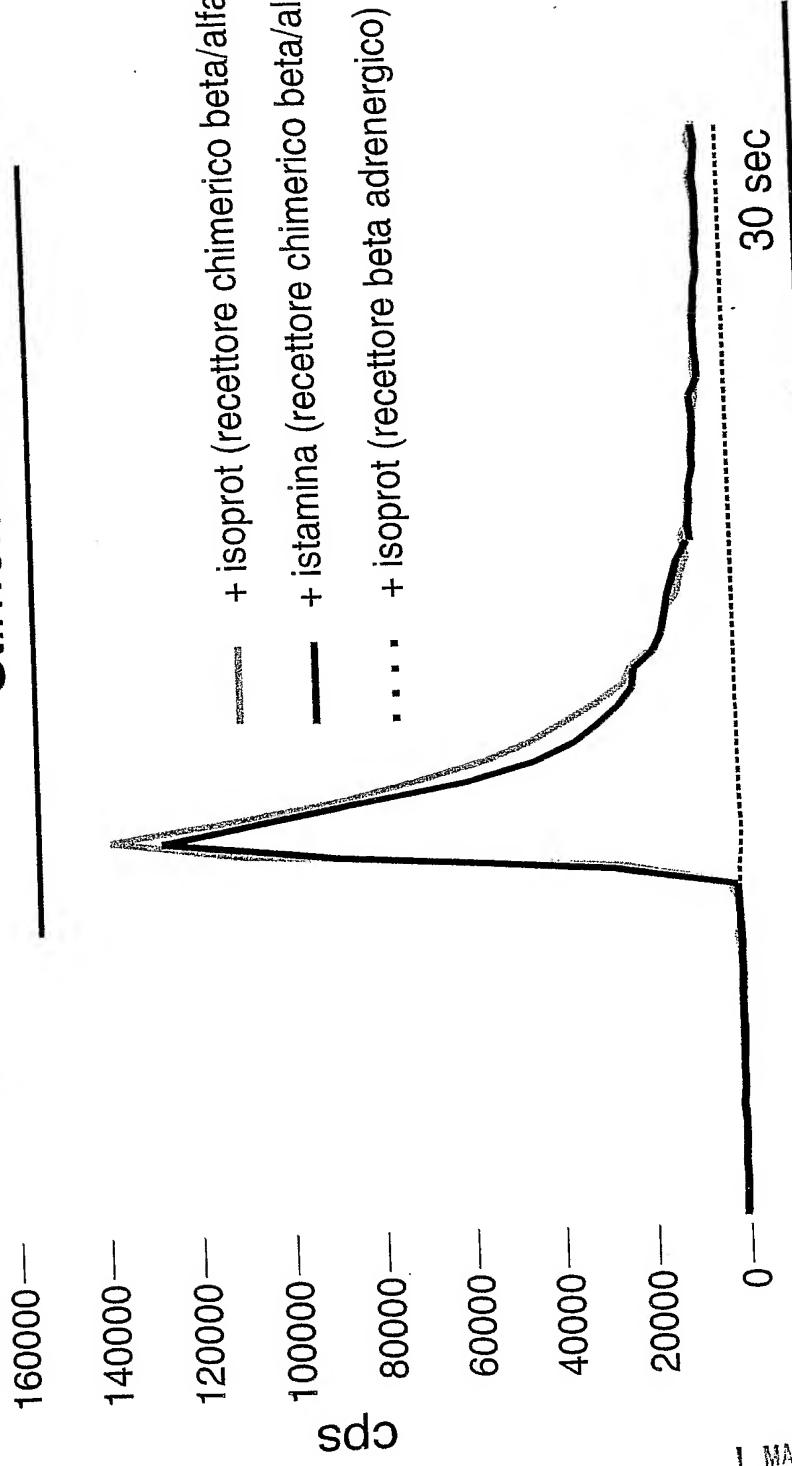




I MANDATARI
(firma) *Giulio Mazzoni*
(per sè e per gli altri)

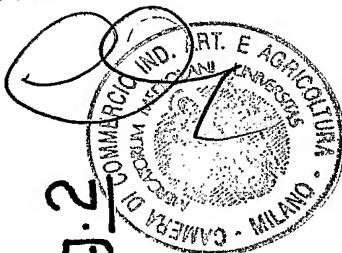
Fig. 1

Stimolazione



MI 2004 A 000598

Fig. 2



1 MANDATARIA

(firma)

Decimo
(per sé e per gli altri)

